

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-268178

(43)Date of publication of application : 27.11.1986

(51)Int.Cl.

C12N 9/06
 //(C12N 9/06
 C12R 1:15)

(21)Application number : 60-108422

(71)Applicant : NODA SANGYO KAGAKU KENKYUSHO

(22)Date of filing : 22.05.1985

(72)Inventor : HORIUCHI TATSUO
 KUROKAWA YOSHIKO

(54) FRUCTOSYLAMINO ACID OXIDASE AND PRODUCTION THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the titled enzyme useful as a reagent for determination of an Amadori compound, by culturing a microbial strain belonging to *Corynebacterium* genus and capable of producing fructosylamino acid oxidase in a medium and separating the enzyme from the culture product.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to *Corynebacterium* genus and capable of producing fructosylamino acid oxidase (e.g. *Corynebacterium* sp NO.2-3-1) is cultured in a medium, and the objective fructosylamino acid oxidase is collected from the culture product. The enzyme catalyzes the enzymatic reaction to oxidize iminodiacetic acid (derivative) to form glyoxylic acid or α -ketoaldehyde, α -amino acid and hydrogen peroxide. The optimum pH is 8W8.5 in the case of using fructosylglycine as a substrate. The stable pH range is 8W10 and the optimum temperature range is 35W45° C. It loses $\geq 90\%$ of the activity by heating at 45° C for 10min. The molecular weight of the enzyme is about 65,000.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-268178

⑤ Int. Cl.⁴
C 12 N 9/06
// (C 12 N 9/06
C 12 R 1:15)

識別記号

庁内整理番号

7236-4B

⑬ 公開 昭和61年(1986)11月27日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全7頁)

⑭ 発明の名称 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ及びその製造法

⑮ 特 願 昭60-108422

⑯ 出 願 昭60(1985)5月22日

⑰ 発 明 者 堀 内 達 雄 野田市柳沢65-1
⑰ 発 明 者 黒 川 淑 子 野田市桜台114の2
⑰ 出 願 人 財団法人 野田産業科 野田市野田399番地
学研究所
⑰ 代 理 人 弁理士 小林 正雄

明 細 書

発 明 の 名 称

フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ及び
その製造法

特 許 請 求 の 範 囲

1. 下記の理化学的性質を有するフルクトシルア
ミノ酸オキシダーゼ。

(a) 作用及び基質特異性：酸素の存在下で、イミ
ノ2酢酸又はその誘導体を酸化して、グリオキシ
ル酸又は α -ケトアルデヒド、 α -アミノ酸
及び過酸化水素を生成する酵素反応を触媒する。

(b) 至適 pH 及び安定 pH 範囲：至適 pH は、フル
クトシルグリシンを基質とした場合に pH 8.0
～ 8.5 (リン酸緩衝液)、安定 pH 範囲は 8.0
～ 10.0。

(c) 作用適温の範囲：35～45℃。

(d) 熱安定性：35℃、10分間の加熱に対して
安定であるが、45℃、10分間の加熱により
90%以上失活する。

(e) 分子量：カラムゲル濾過法で測定した値は約
65000である。

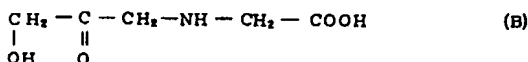
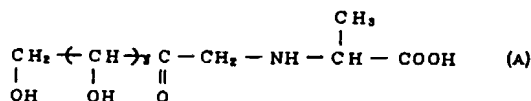
2. フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを生産す
るコリネバクテリウム属に属する微生物を培地
に培養し、培養物よりフルクトシルアミノ酸オ
キシダーゼを採取することを特徴とする、フル
クトシルアミノ酸オキシダーゼの製造法。

発 明 の 詳 細 な 説 明

本発明は新規な酵素フルクトシルアミノ酸オ
キシダーゼ及びその製造法に関する。

フルクトシルアミノ酸オキシダーゼは、イミ
ノ2酢酸及びその誘導体を酸化してグリオキシ
ル酸又は α -ケトアルデヒド、 α -アミノ酸及
び過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素で
ある。食品や生体内では還元性の糖、特にアル
ドースと呼ばれるアルデヒド基を有する糖と蛋
白質、ペプチド、アミノ酸等のようにアミノ基
を有する物質が共存する場合、両者が不可逆的
に結合してケトアミン化合物が生成してくる。

この化合物はアルデヒド基とアミノ基の結合物がアマドリ転移を起こした結果生成されることからアマドリ化合物と呼ばれている。例えばグルコースとアラニンからは次式 A のフルクトシルアラニンが生成する。またグリセルアルデヒドとグリシンからは次式 B のヒドロキシアセトニルグリシンが生成する。



このようにアルドースと α -アミノ酸が結合してアマドリ転移を起こした化合物は、その分子内に共通にイミノ2酢酸の基本骨格を含有しており、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼによつて酸化分解され、 α -ケトアルデヒド、 α -アミノ酸及び過酸化水素を生成する。また一

ヒドロキシメチル-2-フルフルアルデヒドをチオバルビツール酸によつて比色定量する方法 (FEBS レター (1976) 71、356~360 頁参照) など。しかしこれらの方法は操作の容易性及び精度の点で満足できるものではなかった。

本発明者らはアマドリ化合物のうちフルクトシルグリシンを分解する微生物を広く自然界より検索した結果、新たに土壌より分離したコリネバクテリウム属に属する細菌の培養物中に、フルクトシルグリシンを酸化分解してグルコン、グリシン及び過酸化水素を生成する酵素を見出して本発明を完成した。

本発明は、下記の理化学的性質を有するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼである。また本発明は、このフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを生産するコリネバクテリウム属に属する微生物を培地に培養し、培養物よりフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを採取することを特徴とするフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造

方アマドリ化合物はアルデヒド基を有する物質とアミノ基を有する物質が接触した瞬間から化学的にかつ不可逆的に生成蓄積されてくる。その生成速度は原料物質の濃度、接触時間、温度などの関数で表わされる。それ故、その蓄積量を測定することによつて、過去の糖及びアミノ化合物の濃度、接触時間、保持温度などを推定することができる。しかしその定量は比較的困難であり、処理中の分解に起因する精度の低下を免れ得なかつた。

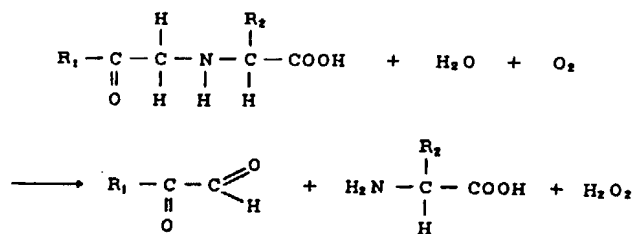
従来の定量法としては例えば下記の方法が知られている。アミノ酸分析計を用いる方法 (ジャーナル・アグリカルチュアル・フード・ケミストリー、24 巻 1 号 (1976) 70 頁参照)、アマドリ化合物を水素化ホウ素ナトリウムで還元したのち塩酸分解してカラムクロマトグラフィーで分離する方法 (アチーブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (1977) 181、542~549 頁参照)、アマドリ化合物を弱酸と加熱して生成する 5-

法である。

本発明の酵素 (フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ) の理化学的性質は下記のとおりである。

(1) 作用及び基質特異性:

酵素の存在下で、イミノ2酢酸又はその誘導体を酸化して、グリオキシル酸又は α -ケトアルデヒド、 α -アミノ酸及び過酸化水素を生成する下記の酵素反応を触媒する酵素である。



この式中、 R_1 は基 $-\text{OH}$ 、 $-\text{[CH(OH)]}_n-\text{CH}_2\text{OH}$ 又は $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-$ 、 n は 0~4 の整数、 R_2 は α -アミノ酸の残基を示す。

なお、本酵素は β -アミノ酸例えば β -アラニン等、イミノ酸例えばプロリン等、メチルア

ミン、エタノールアミン等のアマドリ化合物に対しては作用しない。またケトン還元したものの例えばグルシトリルグリシン等にも作用しない。

(2) 至適 pH :

本酵素の至適 pH は、フルクトシルグリシンを基質とした場合、第 1 図に示すごとく pH 8.0 ~ 8.5 である。測定は酸素の吸収速度をオキソゲンモニターで計測することにより行つた。なお図中の使用緩衝液は下記のとおりである。

- : 0.1 M リン酸カリウム緩衝液
- ×—× : 0.1 M ペロナール—塩酸緩衝液
- △—△ : 0.1 M グリシン—NaOH 緩衝液

(3) pH 安定性 :

本酵素 0.1 単位を含有する各種緩衝液 0.2 ml を 40℃、10 分間加熱し、残存した酵素活性を調べた。その結果は第 4 図に示すとおりである。なお図中の使用緩衝液は下記のとおりである。

- : 0.1 M リン酸カリウム緩衝液

用酵素液中の活性単位とする。

第 2 法 : 酵素反応にともなつて吸収される酸素量を測定する方法

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 2.9 ml を YSI 社製オキソゲンモニターの測定容器にとり、0.5 M フルクトシルグリシン 0.1 ml を加え、37℃で 10 分間撹拌し、溶存酸素と温度を平衡に達せしめる。これに酸素電極を差し込み、密閉したのち、酵素溶液 50 μ l を注入し、生じる酸素吸収をモニターに接続した記録計で連続的に計測し、その最初の速度を測定する。あらかじめ同様にして容器内の酸素濃度と記録値の間で標準曲線を作成し、これを用いて測定値から酸素濃度を求める。37℃、1 分間当たり 1 マイクロモルの酸素吸収を起こす酵素の活性を 1 単位とする。

(5) 作用適温の範囲 :

フルクトシルグリシンを基質にして、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 中で、酵素反応により生成するグリシンを液体クロマトグラフィーで分

△—△ : 0.1 M リン酸ナトリウム—0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液

×—× : 0.1 M グリシン—NaOH 緩衝液

(4) 力価の測定法 :

第 1 法 : 生成される過酸化水素を発色定量する方法

0.05% 4-アミノアンチピリン及び 0.015% 2,4-ジクロロフェノールサルホネートを含有する 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 2.8 ml を試験管にとり、400 U/ml のパーオキシダーゼ溶液 10 μ l を加える。温度平衡を 37℃に達せしめたのち、適当な活性を有する酵素溶液 0.1 ml を加え、さらに 0.5 M フルクトシルグリシン—0.1 ml を加えて 10 分間反応させ、生じた色素を光電比色計を用いて 510 nm における吸光度を測定する。別にあらかじめ過酸化水素の標準溶液を用いて、その生成色素量との関係を調べたグラフを用意する。このグラフを用いて、37℃、1 分間当りに生成される過酸化水素のマイクロモルを計算し、この数字を使

離定量する方法によつて測定した。その結果は第 2 図に示すとおりで、本酵素の作用適温の範囲は 35 ~ 45℃である。

(6) 熱安定性 :

精製酵素 0.1 単位を含有する酵素液 0.5 ml (0.1 M リン酸緩衝液、pH 8.0) を各温度で 10 分間放置したのち、残存した酵素活性を調べた。その結果は第 3 図に示すとおりで、35℃以下では安定であるが、45℃で 90% が失活する。

(7) 阻害活性化及び安定化 :

0.1 M トリスメ—塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で、酸素吸収を測定することによつて調べた。濃度 2 mM の各物質の本酵素に対する影響は、下記のとおりである。Hg⁺⁺、Pb⁺⁺、SDS は強く阻害し、Ni⁺⁺、Zn⁺⁺ は中程度に阻害する。各種キレート剤及び SH 試薬は微弱な阻害しか与えなかつた。また本酵素に対する活性化剤及び安定化剤については未知である。

(8) 精製方法 :

本酵素は後記の精製方法によつて精製することができる。

(9) 分子量：

本酵素の分子量は、セファデックス G-200 を用いたカラムゲル濾過法で測定した結果、0.1 M 食塩含有 0.05 M リン酸緩衝液中では 65000 であった。

(10) 等電点：

ディスク焦点電気泳動法により測定した結果、 $PI = 4.6$ であった。

(11) ディスク電気泳動：

デービスの pH 9.4 のゲルを用いて 3 mA / ゲルで 5℃、80 分泳動を行い、酵素蛋白をクマジーブリリアントブルー G-250 で染色した。その結果、ゲルのアクリルアミド濃度 7.5 % の時は陽極側に 4.1 cm (ブロムフェノールブルーは 4.5 cm)、15 % の時には同じく陽極側に 1.7 cm の所に酵素活性を持つ単一なバンドを認めた。

前記のように本酵素は、その作用及び基質特異性において、従来全く知られていない新規な酵素である。

(a) 形態：顕微鏡的観察 (肉汁寒天培地 30℃、1～3 日間の観察)

- (1) 細胞の大きさ： $0.3 \times 0.9 \sim 0.3 \times 1.0$ ミクロンの桿菌
- (2) 細胞の多形性：わずかにわん曲した形態を持つ、菌糸状の生育、分枝は認められない。
- (3) 運動性：認められない。
- (4) 胞子の有無：認められない。
- (5) グラム染色性：陽性
- (6) 抗酸性：陰性

(b) 各培地における生育状態

- (1) 肉汁寒天平板培養：30℃、48 時間の培養で直径 1.5 ミリメートルの円形で表面平滑で光沢のあるコロニーを作り、半透明で淡黄色を帯びる。培養時間の経過とともに不透明になつていく、拡散性の色素は作らない。
- (2) 肉汁寒天斜面培養：生育は良好で (1) に同じ。

次に本発明によるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造法について説明する。本発明において使用される微生物はコリネバクテリウム属に属し、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ生産能を有するものであればいずれでもよいが、具体例としてはコリネバクテリウム・エスビー (Corynebacterium sp.) 株 2-3-1 が挙げられ、該菌の変種もしくは変異株も用いられる。コリネバクテリウム・エスビー 株 2-3-1 は、本発明者らが土壤中より新たに分離した菌株であり、その菌学的性質は下記のとおりである。

- (3) 肉汁液体培地：静置培養では、生育悪くわずかな混濁と菌の沈殿を認めるだけであるが振盪すると均一に良く生育する。
- (4) 肉汁ゼラチン穿刺培養：25℃、3 日程では菌への生育はわずかに認められるが、溶解は認められない。6 日目程度になると菌の周囲だけわずかに液化する。
- (5) リトマスミルク：紫色になり長時間の培養を行うと凝固せずペプトン化する。

(c) 生理的性質

- (1) 硝酸塩の還元：陰性
- (2) 脱窒反応：陰性
- (3) MR テスト：陰性
- (4) VP テスト：陰性
- (5) インドールの生成：陰性
- (6) 硫化水素の生成：弱い陽性
- (7) 澱粉の加水分解：陰性
- (8) クエン酸の利用：コーザー及びクリステンセンの両方で陽性
- (9) 無機窒素源： NH_4^+ 及び NO_3^- の両方とも利用する。

- (10) 色素の生成：淡黄色色素を作る。
(11) ウレアーゼ：陽性
(12) オキシダーゼ：陰性
(13) カタラーゼ：陽性
(14) 生育の範囲と最適温度：10～39℃
" pH：4.2～10.0
(15) 酸素に対する態度：好氣的
(16) O-Fテスト：極めて弱い酸化的
(17) 糖から酸及びガスの生成

	酸	ガス
(1) L-アラビノース	—	—
(2) D-キシロース	—	—
(3) D-グルコース	—	—
(4) D-マンノース	—	—
(5) D-フラクトース	—	—
(6) D-ガラクトース	—	—
(7) 麦芽糖	—	—
(8) ショ糖	—	—
(9) 乳糖	—	—
(10) トレハロース	—	—
(11) D-ソルビット	—	—

から、コリネバクテリウム・ファシアンス (*Corynebacterium fascians*) に近縁な菌株と認められるが、本菌株が土壌から分離したものであり、植物病原菌でなく、グロースファクターを必要とせず、通常培地で良く生育する点で異っており、コリネバクテリウム属に属する新菌種の菌と判定され、本菌株をコリネバクテリウム・エスピー・底 2-3-1 と命名した。なお、コリネバクテリウム・エスピー・底 2-3-1 は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に、微工研菌寄第 8245 号 (FERM P-8245) として寄託されている。

次に本発明で使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機塩、その他栄養素を適宜含有していれば合成培地、天然培地いずれでも使用可能である。炭素源としては、例えばグルコース、フルクトース、キシロース、グリセリン等を用いることができる。窒素源としては、ペプトン、カゼイン消化物、大豆粉等の蛋白質又はその消化物、あるいは酵母エキスの窒素性有機物が

- | | | |
|--------------|---|---|
| (12) D-マンニット | — | — |
| (13) イノシット | — | — |
| (14) グリセリン | — | — |
| (15) 澱粉 | — | — |

その他セルロースの分解能は認められない。

前記の菌学的性質を有するコリネバクテリウム・エスピー属 2-3-1 の分類学上の位置について、「バージェイズ・マニユアル・オブ・デタミネイティブ・バクテリオロジイ」第 8 版（1974 年）の分類と対比検討した結果、本菌株はグラム陽性の好氣的無胞子桿菌であり、カタラーゼ陽性、運動性がない、ゼラチン、カゼインをわずかながら分解する、糖から酸の生成を行わない、生活環にともなつて極端な細胞の多形性を示さない、セルロースを分解しないことからコリネバクテリウム属に属するものと判定される。さらに本菌株の分離源が動物質に由来しないこと、ゼラチンを溶解すること、ウレアーゼを生産すること、37℃で生育すること

好適に利用できる。無機物としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マンガン、マグネシウム、鉄、コバルト等の塩類が使用できる。本発明においては、フルクトシルアミノ酸を含有する培地で培養したときには、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが最も収量よく得られる。該培地の好適な例としては、例えばグルコース 0.3 %、フルクトシルグリシン 0.5 %、酵母エキス 0.2 %、ポリペプトン 0.2 %、磷酸水素 1 カリウム 0.2 %、硫酸マグネシウム 0.05 %、塩化カルシウム 0.01 %、硫酸第 1 鉄 0.01 % (pH 6.5) の培地が挙げられる。培養は通常 25 ~ 37 °C の範囲で、好適には 30 °C 付近で行われる。培養開始の pH は 6 ~ 8 の範囲であるが、好適には 6.5 付近である。このような条件下で、16 ~ 24 時間振盪又は深部攪拌培養すれば、培養物中にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが効率良く生産され、繁殖する。

本酵素は、培養時間を長くすると菌が溶解して菌体外にも存在するようになるが、通常は菌

体中に存在するので、培養物を遠心分離又は伊過して菌体を集め、適量の緩衝液に懸濁して菌体を破壊することによつて酵素を可溶化することが必要である。こうして得られた酵素含有液から、核酸、細胞壁断片等を取り除くことによつてフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを得ることができる。さらに本酵素は必要により酵素の単離精製の常法に従つて、例えば(1)DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー、(2)硫酸分画、(3)フェニルセファロースカラムクロマトグラフィー、(4)セファデックスG-200カラムクロマトグラフィー等の方法、又はその他の方法を必要に応じて組み合わせて用いることにより精製酵素を得ることができる。本酵素の精製の具体例を示すと下記のとおりである。

培養物中から菌体を集めたのち、0.02 M リン酸緩衝液 pH 7.5 に懸濁し、10 % 量のグリセリンと1 % 量のトリトンX-100を加え溶解したのち、ダイノミル(シンマルエンタープライズ社(スウェーデン)製)を使用して菌体

実施例

コリネバクテリウム・エスビー62-3-1 (FERM P-8245) をフルクトシルグリシン 0.5 %、イーストエキス 0.2 %、ポリペプトン 0.2 %、リン酸 2 水素カリウム 0.2 %、硫酸マグネシウム 0.05 %、塩化カルシウム 0.01 %、硫酸第1鉄 0.01 % 及びグルコース 0.3 % を含有した培地 (pH 6.5) 100 ml を入れた坂口フラスコ (500 ml 容量) に植菌し、30℃ 18 時間振盪培養した。この種培養物を30 l のジャーファーマンター中の同一培地 20 l に植え、通気量 20 l、攪拌速度 350 rpm の条件で30℃、20 時間培養した。培養物を12000 rpm で遠心分離し菌体を集めた。その培養菌体の一部 (100 g) に 0.02 M トリシュー塩酸緩衝液 (10 % グリセリンと1 % トリトンX-100 を含有する) pH 7.5、80 ml を加え、菌をよく分散させ、氷で4℃まで冷却した。この液について、ダイノミルによる菌体の破碎処理 (3000 rpm、7 分) を行つた。破碎容器は氷冷水によつて充

を破碎する。遠心分離して上清を集め、DEAEセルロースカラム (0.02 M リン酸緩衝液 pH 7.5 に平衡化してある) にかけて酵素を吸着させる。食塩 0.25 M を含んだ 0.02 M リン酸緩衝液 pH 7.5 で洗浄したのち、0.5 M 食塩濃度にして酵素を溶出させる。活性画分を集め、16 % になるように硫酸粉末を加える。これを16 % 硫酸を含有した 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.5 に平衡化したフェニルセファロースカラムに通過させて酵素を吸着させる。この酵素を硫酸濃度で 16 % → 0 % の逆濃度勾配とエチレングリコール^{濃度}で 0 → 25 % の濃度勾配をあわせ持った 0.1 M リン酸緩衝液で溶出し、その活性部について、0.1 M 食塩を含有したリン酸緩衝液 pH 7.5 で平衡化したセファデックスG-200 のカラムクロマトグラフィーを行い精製酵素を得ることができる。

本発明によれば、従来定量の困難であつたアマドリ化合物を定量する上で、酵素法という新しい特異性の高いかつ簡便な定量法が可能になる。

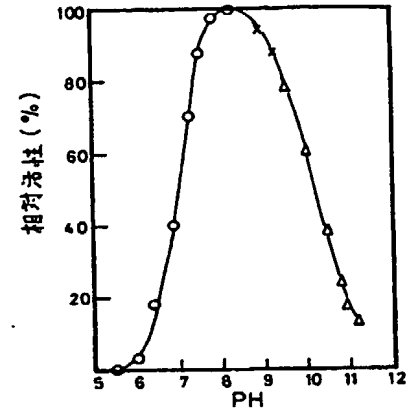
分冷却した。破碎液を12000 rpm で15 分遠心分離して上澄部分を集め、130 ml の液を得た。この液を 0.01 M トリシュー塩酸緩衝液 pH 7.5 に平衡化した DEAE セルロースを充填したカラム (直径 2.5 cm × 長さ 30 cm) にかけて酵素を吸着させた。0 → 0.5 M 食塩濃度勾配による溶出を行つて活性部を集めた。次いでこの酵素液に 16 g / 100 ml の割合に硫酸を溶解させたのち、あらかじめ 16 % 硫酸含有 0.01 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したフェニルセファロースを充填したカラム (直径 1 cm × 長さ 9 cm) を通過させて酵素を吸着させた。これを硫酸濃度の 16 % → 0 % の逆濃度勾配とエチレングリコール濃度の 0 % → 25 % の濃度勾配をあわせもつた 0.01 M トリシュー塩酸緩衝液で溶出した。活性部をアミコン社製限外伊過装置 (分画膜 10000) にて濃縮したのち、セファデックスG-200 を充填したカラム (1.2 × 100 cm) (あらかじめ 0.1 M 食塩含有の 0.05 M トリシュー塩酸緩衝液 pH 7.5 で平衡化

しておく)にかけゲルイ過した。活性部を集めた結果、2.28単位/蛋白の酵素が得られた。収率は23%であつた。

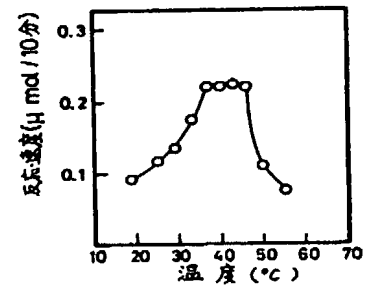
図面の簡単な説明

第1図は本酵素の至適 pH を示すグラフ、第2図は本酵素の作用適温の範囲を示すグラフ、第3図は本酵素の熱安定性を示すグラフ、第4図は pH 安定性を示すグラフである。

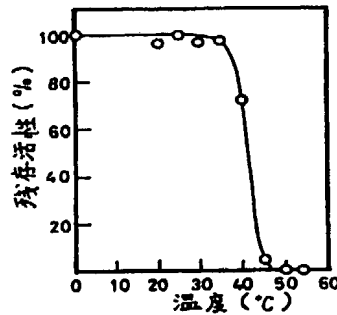
第1図



第2図



第3図



第4図

